

**Primary structure and nucleic acid of the human neutrophil antigen-2a,
useful for antigen detection, e.g. diagnosis of various forms of neutropenia**

Patent number: DE10028725
Publication date: 2001-12-13
Inventor: BUX JUERGEN [DE]; KISSEL KARIN [DE]
Applicant: BUX JUERGEN [DE]
Classification:
- **international:** C07K14/435
- **european:** C07K14/705B28
Application number: DE20001028725 20000609
Priority number(s): DE20001028725 20000609

Abstract of DE10028725

The primary structure of the human neutrophil antigen-2a (HNA-2a, previously known as NB-1), expressed on neutrophilic granulocytes, is new. Independent claims are also included for the following: (1) nucleic acid sequences for HNA-2a; and (2) the deduced amino acid sequence and applications of NHA-2a.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

AO



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 100 28 725 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 07 K 14/435

21 Aktenzeichen: 100 28 725.5
22 Anmeldetag: 9. 6. 2000
43 Offenlegungstag: 13. 12. 2001

DE 100 28 725 A 1

71 Anmelder:
Bux, Jürgen, Dr., 35392 Gießen, DE

72 Erfinder:
Bux, Jürgen, Dr., 35392 Gießen, DE; Kissel, Karin,
35392 Gießen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Primärstruktur des HNA-2a (ehemals NB1)-Antigens

57 Das auf neutrophilen Granulozyten exprimierte HNA-2a(ehemals NB1)-Antigen kann Anlaß zur Antikörperbildung sein, die Immungranulozytopenien und pulmonale Transfusionsreaktionen zur Folge hat. Für die Antigen- und Antikörperdiagnostik mußten bisher Granulozyten arbeits- und zeitaufwendig aus dem Blut typisierter Spender isoliert werden. Voraussetzung für die Entwicklung einfacher diagnostischer Verfahren war die Kenntnis der Primärstruktur des HNA-2a(NB1)-Antigens. Diese wurde von uns aufgeklärt. Hierzu wurde zunächst das Antigen immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt, und die HNA-2a(NB1)-Identität mittels Immunoblot unter Verwendung von Referenzantikörpern bestätigt. Anschließend wurde die N-terminale Aminosäuresequenz durch Edman-Abbau bestimmt und nach Primerkonstruktion die cDNA-Sequenz mittels RACE-PCR ermittelt. Die cDNA-Sequenz wurde in Säugerzellen rekombinant zur Expression gebracht und die Identität des rekombinant exprimierten Glykoproteins mit dem nativen HNA-2a-Antigen durch Bindung von monoklonalen und humanen Antikörpern an das rekombinante Glykoprotein in Antikörperbindungstests (Durchflußzytometrie, Immunoblot, Immunpräzipitation) nachgewiesen. Die ermittelte cDNA-Sequenz wird die Entwicklung von DNA-basierten Antigenbestimmungsmethoden sowie von Antikörpernachweisverfahren unter Verwendung rekombinant hergestellter HNA-2a(NB1)-Antigene in Form von fertig konfektionierten Testkits ermöglichen und damit die Antigen- und Antikörperdiagnostik ...

DE 100 28 725 A 1

AO

[0001] Es ist bekannt, daß das HNA-2a (NB1)-Merkmal zur Bildung von Allo- und Autoantikörpern führen kann. Diese Antikörper können zu Erkrankungen wie der neonatalen Immundefizienz, die transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz, der Immundefizienz nach Knochenmarktransplantation, der Medikament-induzierten Immundefizienz sowie der Autoimmundefizienz führen. Man weiß, daß es sich bei dem HNA-2a (NB1)-Antigen um ein auf einer Subpopulation der Granulozyten exprimiertes Glykoprotein handelt. Die dem Glykoprotein zugrundeliegende Nukleotid- und Aminosäuresequenz ist bisher nicht bekannt gewesen, weshalb die fragilen und nicht lagerbaren Granulozyten für die Antigen- und Antikörper-Diagnostik benutzt werden müssen. Hierzu sind die Granulozyten zunächst arbeits- und zeitaufwendig aus dem Blut von Patienten (Antigennachweis) bzw. ausgesuchter, gesunder Spender (Antikörpernachweis) zu isolieren. Erst dann können die notwendigen Untersuchungen für die Diagnostik der oben angeführten Erkrankungen durchgeführt werden. Dies hatte zur Folge, daß diese Untersuchungen nur von wenigen Speziallaboratorien durchgeführt werden, was wiederum Postversand notwendig macht, bzw. der Patient wegen der Instabilität der Granulozyten zur Blutentnahme zum Speziallabor reisen muß.

[0002] Das Problem der Erfindung lag daher in der Aufklärung der kodierenden Nukleotidsequenz und der hieraus ableitbaren Aminosäuresequenz, um auf die Verwendung von humanen Granulozyten verzichten zu können.

[0003] Zur Lösung dieses Problems wurden zunächst Granulozyten aus dem Blut HNA-2a (NB1) tragender Individuen separiert und anschließend lysiert. Mittels Immunaффinitätschromatographie wurde das Antigen aus dem Granulozytenlysat isoliert. Nach Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das isolierte Antigen mittels Immunoblot unter Verwendung von mehreren Referenzantikörpern als HNA-2a (NB1)-Antigen bestätigt. Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde durch Edman-Abbau ermittelt und Primer zur Aufklärung der cDNA-Sequenz konstruiert. Nach Isolierung von mRNA aus Granulozyten HNA-2a (NB1)-positiver Individuen wurde die cDNA-Sequenz mittels RACE-PCR ("rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction") ermittelt. Die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz enthielt Aminosäuresequenzen von 3 Trypsinspalprodukten des immunchromatographisch isolierten Antigens. Die gefundene Nukleinsäuresequenz wurde in COS- und CHO-Säugerzellen zur Expression gebracht. Das exprimierte Glykoprotein (Antigen) wurde von monoklonalen und humanen Antikörpern sowohl in der Durchflußzytometrie als auch in immunchemischen Methoden wie dem Immunoblot und der Immunpräzipitation erkannt. Somit ist nach derzeit gültigen wissenschaftlichen Maßstäben nachgewiesen, daß die von uns aufgeklärte Nukleinsäuresequenz für das bekannte HNA-2a (NB1)-Antigen codiert. Nukleinsäuresequenz-Datenbanksuchen zeigten, daß der Anfangsteil der Nukleotidsequenz bereits im Rahmen des Human Genome Projekts sequenziert worden waren, ohne jedoch die Bedeutung der Nukleotidsequenz als kodierende Sequenz für das HNA-2a (NB1)-Antigen zu erkennen, was sich auch in den Protein-Datenbanksuchen bestätigte. Bei dem HNA-2a (NB1)-Antigen handelte es sich somit um ein Glykoprotein der Granulozytenmembran mit bislang unbekannter Primärstruktur.

[0004] Mit Hilfe der gewonnenen Nukleotidsequenz lassen sich einfache und sichere molekularbiologische Methoden, z. B. Polymerase-Ketten-Reaktionen, zur Antigenbestimmung entwickeln, die nur geringe Mengen lagerbare DNA und nicht fragile Granulozyten als Ausgangsmaterial erfordern. Die DNA-basierten Techniken erlauben im Gegensatz zu intakten Granulozyten auch einen Versand der Patientenblutproben. Weiterhin kann mit Hilfe der Rekombinationstechnologie das HNA-2a (NB1)-Antigen in großer Menge und ohne Verunreinigungen durch andere humane Glykoproteine hergestellt und in Antikörpernachweisverfahren, z. B. ELISA, eingesetzt werden.

[0005] Sowohl die DNA-basierten Antigentests als auch die Antikörpernachweisverfahren unter Verwendung rekombinanter Antigene lassen sich in Form von fertig konfektionierten Testkits als einfache diagnostische Verfahren für Laboratorien vermarkten. Die Aufklärung der HNA-2a (NB1)-Primärstruktur führt somit zu einer entscheidenden Vereinfachung seiner Antigen- und Antikörper-Diagnostik.

[0006] Die Ausführung der Testkits kann zum Beispiel analog zu den bereits im Handel befindlichen PCR-SSP-Testkits für die molekulare HLA-Antigenbestimmung erfolgen, wobei die Nukleotidsequenzen für die HLA-Primer durch HNA-2a (NB1)-Antigen-spezifische Primersequenzen zu ersetzen wären.

[0007] Der Antikörpernachweistest könnte entsprechend einem ebenfalls bereits auf dem Markt befindlichen Testkit zum Nachweis antinukleärer Antikörper unter Verwendung rekombinant hergestellter Antigene konfiguriert werden. Hierzu könnte die rekombinante Herstellung des HNA-2a (NB1)-Antigens in größerem Stile ebenfalls im Baculovirus-Infektionssystem erfolgreich sein.

ALLGEMEINE ANGABEN

ANMELDER

NAME: Dr. Jürgen Bux

STRASSE: Wartweg 37

ORT: Giessen

LAND: Deutschland

POSTLEITZAHL: 35392

TELEFON: 0170 271 4867

ELEKTRONISCHE POST: Juergen.Bux@immunologie.med.uni-giessen.de

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette

COMPUTER: IBM PC-kompatibel

BETRIEBSSYSTEM: Windows 95

SOFTWARE: Word für Windows

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

LÄNGE: 1584 Basenpaare

ART:Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: nicht bekannt

ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA, Protein

HYPOTHETISCH: nein

ANTI-SENSE: nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens

Zelltyp: Granulozyten

UNMITTELBARE HERKUNFT:

m-RNA aus humanen Granulozyten

POSITION IM GENOM:

Chromosom 19

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: CDS

LAGE: 1 ... 1614

DE 100 28 725 A 1

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: 28 ... 90

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Reifes Peptid

LAGE: 91 ... 1338

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No: 1

15	AAA	GAG	ATT	ACC	AGC	CAC	AGA	CGG	GTC	ATG	AGC	CCG	GTA	39
										Met	Ser	Pro	Val	
										-21				
20	TTA	CTG	CTG	GCC	CTC	CTG	GGG	TTC	ATC	CTC	CCA	CTG	CCA	78
	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Leu	Pro	Leu	Pro	
			-15					-10					-5	
25	GGA	GTG	CAG	GCG	CTG	CTC	TGC	CAG	TTT	GGG	ACA	GTT	CAG	117
	Gly	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Cys	Gln	Phe	Gly	Thr	Val	Gln	
					1				5					
30	CAT	GTG	TGG	AAG	GTG	TCC	GAC	CTG	CCC	CGG	CAA	TGG	ACC	156
	His	Val	Trp	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Pro	Arg	Gln	Trp	Thr	
	10					15					20			
35	CCT	AAG	AAC	ACC	AGC	TGC	GAC	AGC	GGC	TTG	GGG	TGC	CAG	195
	Pro	Lys	Asn	Thr	Ser	Cys	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Gln	
			25					30					35	
40	GAC	ACG	TTG	ATG	CTC	ATT	GAG	AGC	GGA	CCC	CAA	GTG	AGC	234
	Asp	Thr	Leu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Gly	Pro	Gln	Val	Ser	
					40					45				
45	CTG	GTG	CTC	TCC	AAG	GGC	TGC	ACG	GAG	GCC	AAG	GAC	CAG	273
	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Thr	Glu	Ala	Lys	Asp	Gln	
		50					55					60		
50	GAG	CCC	CGC	GTC	ACT	GAG	CAC	CGG	ATG	GGC	CCC	GGC	CTC	312
	Glu	Pro	Arg	Val	Thr	Glu	His	Arg	Met	Gly	Pro	Gly	Leu	
				65					70					
55	TCC	CTG	ATC	TCC	TAC	ACC	TTC	GTG	TGC	CGC	CAG	GAG	GAC	351
	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Phe	Val	Cys	Arg	Gln	Glu	Asp	
	75					80					85			
60	TTC	TGC	AAC	AAC	CTC	GTT	AAC	TCC	CTC	CCG	TTT	TGG	GCC	390
	Phe	Cys	Asn	Asn	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	
			90					95					100	

DE 100 28 725 A 1

CCA Pro	CAG Gln	CCC Pro	CCA Pro	GCA Ala 105	GAC Asp	CCA Pro	GGA Gly	TCC Ser	TTG Leu 110	AGG Arg	TGC Cys	CCA Pro	429	5
GTC Val	TGC Cys 115	TTG Leu	TCT Ser	ATG Met	GAA Glu	GGC Gly 120	TGT Cys	CTG Leu	GAG Glu	GGG Gly	ACA Thr 125	ACA Thr	468	10
GAA Glu	GAG Glu	ATC Ile	TGC Cys 130	CCC Pro	AAG Lys	GGG Gly	ACC Thr	ACA Thr 135	CAC His	TGT Cys	TAT Tyr	GAT Asp	507	15
GGC Gly 140	CTC Leu	CTC Leu	AGG Arg	CTC Leu	AGG Arg 145	GGA Gly	GGA Gly	GGC Gly	ATC Ile	TTC Phe 150	TCC Ser	AAT Asn	546	20
CTG Leu	AGA Arg	GTC Val 155	CAG Gln	GGA Gly	TGC Cys	ATG Met	CCC Pro 160	CAG Gln	CCA Pro	GGT Gly	TGC Cys	AAC Asn 165	585	25
CTG Leu	CTC Leu	AAT Asn	GGG Gly 170	ACA Thr 170	CAG Gln	GAA Glu	ATT Ile	GGG Gly 175	CCC Pro	GTG Val	GGT Gly	ATG Met	624	30
ACT Thr 180	GAG Glu	AAC Asn	TGC Cys	AAT Asn	AGG Arg	AAA Lys 185	GAT Asp	TTT Phe	CTG Leu	ACC Thr	TGT Cys 190	CAT His	663	35
CGG Arg	GGG Gly	ACC Thr	ACC Thr 195	ATT Ile	ATG Met	ACA Thr	CAC His	GGA Gly 200	AAC Asn	TTG Leu	GCT Ala	CAA Gln	702	40
GAA Glu 205	CCC Pro	ACT Thr	GAT Asp	TGG Trp	ACC Thr 210	ACA Thr	TCG Ser	AAT Asn	ACC Thr	GAG Glu 215	ATG Met	TGC Cys	741	45
GAG Glu	GTG Val 220	GGG Gly	CAG Gln	GTG Val	TGT Cys	CAG Gln 225	GAG Glu	ACG Thr	CTG Leu	CTG Leu	CTC Leu	ATA Ile 230	780	50
GAT Asp	GTA Val	GGA Gly	CTC Leu	ACA Thr 235	TCA Ser	ACC Thr	CTG Leu	GTG Val	GGG Gly 240	ACA Thr	AAA Lys	GGC Gly	819	55
TGC Cys 245	AGC Ser	ACT Thr	GTT Val	GGG Gly	GCT Ala	CAA Gln 250	AAT Asn	TCC Ser	CAG Gln	AAG Lys	ACC Thr 255	ACC Thr	858	60
ATC Ile	CAC His	TCA Ser	GCC Ala 260	CCT Pro	CCT Pro	GGG Gly	GTG Val	CTT Leu 265	GTG Val	GCC Ala	TCC Ser	TAT Tyr	897	65

DE 100 28 725 A 1

5	ACC Thr 270	CAC His	TTC Phe	TGC Cys	TCC Ser	TCG Ser 275	GAC Asp	CTG Leu	TGC Cys	AAT Asn	AGT Ser 280	GCC Ala	AGC Ser	936
10	AGC Ser	AGC Ser	AGC Ser 285	GTT Val	CTG Leu	CTG Leu	AAC Asn	TCC Ser 290	CTC Leu	CCT Pro	CCT Pro	CAA Gln	GCT Ala 295	975
15	GCC Ala	CCT Pro	GTC Val	CCA Pro	GGA Gly 300	GAC Asp	CAG Gln	CAG Gln	TGT Cys	CCT Pro 305	ACC Thr	TGT Cys	GTG Val	1014
20	CAG Gln 310	CCC Pro	CTT Leu	SGA Gly	ACC Thr	TGT Cys	TCA Ser 315	AGT Ser	GGC Gly	TCC Ser	CCC Pro	CGA Arg 320	ATG Met	1053
25	ACC Thr	TGC Cys	CCC Pro	AGG Arg 325	GGC Gly	GCC Ala	ACT Thr	CAT His	TGT Cys 330	TAT Tyr	GAT Asp	GGG Gly	TAC Tyr	1092
30	ATT Ile 335	CAT His	CTC Leu	TCA Ser	GGA Gly	GGT Gly 340	GGG Gly	CTG Leu	TCC Ser	ACC Thr	AAA Lys 345	ATG Met	AGC Ser	1131
35	ATT Ile	CAG Gln	GGC Gly 350	TGC Cys	GTG Val	GCC Ala	CAA Gln	CCT Pro 355	TCC Ser	AGC Ser	TCC Ser	TTG Leu	TTG Leu 360	1170
40	AAC Asn	CAC His	ACC Thr	AGA Arg	CAA Gln 365	ATC Ile	GGG Gly	ATC Ile	TTC Phe	TCT Ser 370	GCG Ala	CGT Arg	GAG Glu	1209
45	AAG Lys	CGT Arg 375	GAT Asp	GTG Val	CAG Gln	CCT Pro	CCT Pro 380	GCC Ala	TCT Ser	CAG Gln	CAT His	GAG Glu 385	GGA Gly	1248
50	GGT Gly 400	GGG Gly	GCT Ala	GAG Glu 390	GGC Gly	CTG Leu	GAG Glu	TCT Ser	CTC Leu 395	ACT Thr	TGG Trp	GGG Gly	GTG Val	1287
55	GGG Gly 400	CTG Leu	GCA Ala	CTG Leu	GCC Ala	CCA Pro 405	GCG Ala	CTG Leu	TGG Trp	TGG Trp	GGA Gly 410	GTG Val	GTT Val	1326
60	TGC Cys	CCT Pro	TCC Ser	TGC Cys 415										1338
65	TA	AC	CT	CT	ATT	AC	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	1339
	AC	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	1411
	CA	TT	CT	GT	CC	AT	CA	TT	CT	CT	CT	CT	CT	1461
	AC	CT	AA	CA	GC	AG	AG	CT	CT	GC	AT	CT	CT	1511
	GG	AG	AG	GG	GA	CG	CT	GG	AG	GT	AT	CT	CT	1561
	TG	TC	CT	TT	CA	AAAA	AAAA							1614

Patentansprüche

1. Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Immunhämatologie und betrifft die von uns aufgeklärte Primärstruktur des HNA-2a (ehemals NB1)-Antigens. Dieses Antigen wird auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und wurde von seinem Erstbeschreiber "NB1" genannt. Nach der Revision der Nomenklatur für Granulozytenantigene wird es "HNA-2a" (human neutrophil antigen 2a) bezeichnet. 5
2. Für die von uns aufgeklärte Nukleotidsequenz, die davon abgeleitete Aminosäuresequenz und die sich hieraus ergebenden Nutzungsmöglichkeiten für das HNA-2a (NB1)-Antigen wird patentrechtlicher Schutz beantragt. Nutzungsmöglichkeiten stellen RNA- oder DNA-basierte-Verfahren zum Antigennachweis wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion mit, sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP), die Hybridisierungsreaktionen mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden oder DNA-Sequenzierungsverfahren dar. Weitere Nutzungsmöglichkeiten ergeben sich aus der rekombinanten Herstellung des HNA-2a-Antigens zum Nachweis von HNA-2a-spezifischen Alloantikörpern. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -